

critical pH on adding the acidic dithionite, LAURELL released carbon dioxide from the serum by deep freezing for 24 hours, followed by thawing. In the present investigation the procedure followed was to buffer the reagent to pH approximately 7.5 by adding Tris, so that even fresh serum could be used without any risk.

The makrolon tubes supplied are packed in dust-tight containers and can be used immediately so that time-consuming cleaning of glass ware is avoided.

The use of phenol results in a complete deproteinisation during the heating and the supernatant is optically clear.

References

1. HENRY, R. J., C. H. SOBEL and N. CHIAMORI, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 3, 523 (1958). — 2. RAMSAY, W. N. M., Clin. chim. Acta (Amsterdam) 2, 221 (1957). — 3. LAURELL, C.-B., Acta physiol. Scand., 14, suppl. 46 (1947). — 4. FLODIN, P., Dextran gels and their applications in gel filtration. Thesis, Uppsala (1962). — 5. BARBER, A., C. DEMPSTER and N. ANDERSON, Clin. chim. Acta

(Amsterdam) 8, 143 (1963). — 6. LONDON, M. Clin. Chem. New York 10, 789 (1964). — 7. PATRICK, R. L. and R. E. THIERS, Clin. Chem. New York 9, 283 (1963). — 8. GIOVANNIELLO, TIT. J., and TH. PETERS, Standard methods of clinical chemistry, 1V, p. 139. Hrsg. D. Seligson, Academic Press, New York (1963).

I. Nielsen
Centralsygehuset
Hjørring, Denmark

Qualitative Veränderungen verschiedener jodierter phenolischer Aminosäuren im Laufe einer alkoholischen Extraktion aus wäßrigen Lösungen

Von E. ZAPPI und G. HOPPE

*Aus der I. Medizinischen Klinik des Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhauses Berlin-Schöneberg
(Direktor: Prof. Dr. K. H. Pfeiffer)*

(Eingegangen am 10. Oktober 1967)

Es werden die chemischen Veränderungen, die einige jodierte phenolische Aminosäuren im Verlaufe einer Extraktion aus wäßrigen Lösungen erfahren, untersucht. Die durchgeführten chemischen und dünnschichtchromatographischen Kontrollen zeigen, daß die prozentualen Verluste der Ausgangssubstanzen meistens relativ geringfügig sind. Die im Verlauf der Extraktion neugebildeten Verbindungen lassen sich, mit nur einer Ausnahme, als jodierte phenolische Aminosäuren identifizieren.

The qualitative changes which occur in a number of iodinated phenolic amino acids during alcoholic extraction from aqueous solutions, were investigated.

Thin-layer chromatographic controls showed that in most cases the decomposition of the starting materials is relatively small. The new compounds formed during the extraction can be classified, with one exception, as iodinated phenolic amino acids.

Aufgrund früherer Untersuchungen über die Verteilungskoeffizienten verschiedener jodierter phenolischer Aminosäuren in einer Reihe wäßrig-organischer Zweiphasen-Systeme (1) wurde eine Methode entwickelt, diese Substanzen aus dem Serum zu gewinnen. Die hohe Ausbeute ermöglicht nach weitergehender Reinigung des Extraktes in Verbindung mit einem jüngst beschriebenen dünnschichtchromatographischen System (2) die Trennung und Identifikation zirkulierender Schilddrüsenhormone und Derivate (3, 4).

Die Frage der eventuellen Zersetzung der jodierten Substanzen im Verlauf der Extraktion wird hier mittels reiner wäßriger Lösungen verschiedener Jodtyrosine und Jodthyronine, die der Extraktion unterworfen wurden, näher untersucht. Die Kontrollen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Anwendung einer relativ einfachen Technik — auch hier beschrieben — gestattet die Auswertung der Intensität der vorhandenen Flecken auf den Chromatogrammen durch Extinktionsmessung.

Methodik

Als Versuchssubstanzen wurden folgende jodierte phenolische Aminosäuren verwendet: 3-Monojod- und 3,5-Dijod-L-Tyrosin, 3-Monojod-, 3,5-Dijod-, 3,3',5-Trijod- und 3,3',5,5'-Tetrajod-DL-thyronin (MIT, DIT, T₁, T₂, T₃, T₄). Diese Substanzen wurden mit 0,05N NaOH (0,5 mg pro ml) gelöst und getrennt bearbeitet.

Extraktionsverfahren

Die Extraktion wurde folgendermaßen durchgeführt: 6 ml von jeder der angesetzten Lösungen (gleich 3 mg Versuchssubstanz) wurden in Zentrifugenröhrchen mit Schliff (etwa 65 ml Fassungsvermögen) mit 0,5 ml 1M Propylthiouracillösung versetzt, mit einigen Tropfen konz. Essigsäure auf pH < 5 eingestellt und 5 Min. mit 15 ml Methanol am Rückflußkühler gekocht.

Die wäßrig-alkoholische Phase wird nun mit 2 g einer Mischung Natriumsulfat-Aktivkohle 200:1 geschüttelt, zentrifugiert und nach Abtrennung des Rückstandes in ein anderes Schliffröhrchen überführt und am Rotationsverdampfer bei Unterdruck und 55–60° eingengt. Der Unterdruck wurde durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt. Der trockene Rückstand wird mit 3 ml 0,05N NaOH aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von etwa 45 ml gebracht. Das vorherige Röhrchen wird mit 3 ml 0,05N NaOH nachgespült und dieser Anteil mit dem anderen gemischt. Die wäßrige Lösung wird nach Kontrolle mit

Indikatorpapier ($\text{pH} > 10$) einer Extraktion mit 7 ml Petroläther (Siedebereich $30-50^\circ$) durch Schütteln und Zentrifugieren unterworfen. Nach der Entfernung der überstehenden Phase wird in derselben Weise eine Extraktion mit Chloroform durchgeführt. Dieses wird ebenfalls nach Zentrifugieren größtenteils abgesaugt und der Rest bei Unterdruck abgedampft.

Der pH der wäßrigen Phase wird mit konz. Essigsäure auf einen Wert < 5 eingestellt. Die wäßr. Phase wird mit 10 ml redestilliertem n-Butanol geschüttelt und zentrifugiert. Die überstehende Phase wird sorgfältig abgesaugt und aufgehoben; die wäßrige wird mit 4 ml Butanol wieder kurz geschüttelt und zentrifugiert. Man saugt ebenso die alkoholische Phase ab, die mit der ersten zusammen in ein Zentrifugenglas (25 ml) überführt wird.

Der butanolische Extrakt wird mit 5 ml Wasser geschüttelt. Nach Zentrifugieren und Absaugen des Wassers wird 1 g Natriumsulfat-Aktivkohlegemisch zugegeben, wieder geschüttelt und zentrifugiert. Der Extrakt wird in einen 10 ml Meßkolben gebracht und mit Butanol auf dieses Volumen ergänzt. Bei 100 proz. Extraktion enthält 1 ml 300 μg Substanz.

Dünnschichtchromatographie

Für die Trennung und Identifikation der infrage kommenden Substanzen wurde vorwiegend ein aufsteigendes dünn-schichtchromatographisches System gewählt, das aus Cellulosepulver mit Gipszusatz als Adsorptionsmittel und Aceton/0,5N Essigsäure 2:8 (V/V) als mobile Phase bestand. 5 Glasplatten ($20 \times 20 \text{ cm}$) wurden mit einer Mischung von 25 g MN 300 G (Macherey, Nagel & Co. Düren) und 150 ml Wasser beschichtet und nach Trocknung im Exsikkator über Blau-Gel aufbewahrt. Die R_F -Werte der untersuchten Substanzen in diesem System sind folgende: MIT, 0,82; DIT, 0,71; T_1 , 0,75; T_2 , 0,65; T_3 , 0,36; T_4 , 0,18. Die maximale Kapazität des Systems (Schichtstärke etwa 1 mm) beträgt 5–10 μg jeder dieser Substanzen: Beim Auftragen größerer Mengen läßt die Trennfähigkeit in zunehmendem Maße nach. Dementsprechend wurde bei den butanolischen Extrakten ein Auftragsvolumen von 30 μl (maximal 9 μg Substanz) nicht überschritten. Die Empfindlichkeit des Jodnachweis-Reagenz gestattet die Erfassung von 0,01–0,05 μg dieser Jodverbindungen.

Zwecks weiterer Identifizierung der nach der Extraktion vorkommenden Verbindungen wurden gegebenenfalls parallele Ansätze der Extrakte mit Kontrollsubstanzen in anderen dünn-schichtchromatographischen Systemen untersucht.

Anfärbung

Für die allgemeine Sichtbarmachung der jodierten Verbindungen leistete das Ferrichlorid-(Kalium)Ferricyanid-Arsenige-Säure-(FFCA)-Reagenz¹⁾ nach GMELIN und VIRTANEN (5) ausgezeichnete Dienste. Nach eigener Modifikation für die Dünnschichtchromatographie (6) ist der Nachweis bis 0,05–0,01 μg jeder der geprüften Jodverbindungen möglich. Zur Bestätigung des Jodgehaltes der durch das Gmelin- und Virtanen-Reagenz dargestellten Flecke wurde die von POSTMES vorgeschlagene Modifikation, Ferrichlorid-(Kalium)Ferricyanid-(FFC)-Reagenz angewendet. Die jodierten Substanzen sind FFCA-positiv aber FFC-negativ, während die Substanzen, die fälschlicherweise positiv reagieren, auch FFC-positiv sind (7).

Zum Nachweis von Aminosäuren und phenolischen Gruppen wurden Ninhydrin bzw. PAULY's Reagenz verwendet (8), dessen Empfindlichkeit jedenfalls um zwei Dezimalstellen höher als bei der Gmelin- und Virtanen-Reaktion liegt.

Auswertung der Chromatogramme

Von den unmittelbar nach der Entwicklung fotografierten Chromatogrammen wurden außer schwarz-weißen Abzügen zur Dokumentation der Ergebnisse andere auf transparentem Film angefertigt. Diese wurden, in Streifen zerschnitten, in einem Elphor Integrator (Dr. Bender & Dr. Hobein, München-Karlsruhe-

Zürich) ausgewertet und zu einer Kurve integriert (Abb. 1). Die von jedem Streifen erhaltenen absoluten Extinktionswerte wurden in prozentuale Beziehungen zueinander gesetzt. Diese Technik ist viel leichter durchführbar als die bereits beschriebene direkte Auswertung der Schicht nach Ablösung von der Glasplatte (9).

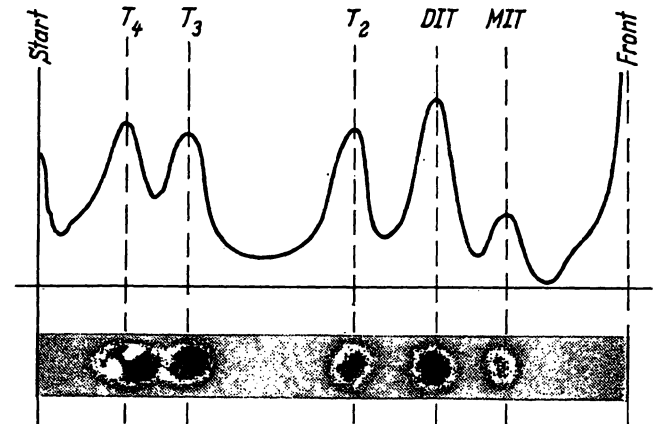


Abb. 1

Densitometrische Auswertung eines Chromatograms

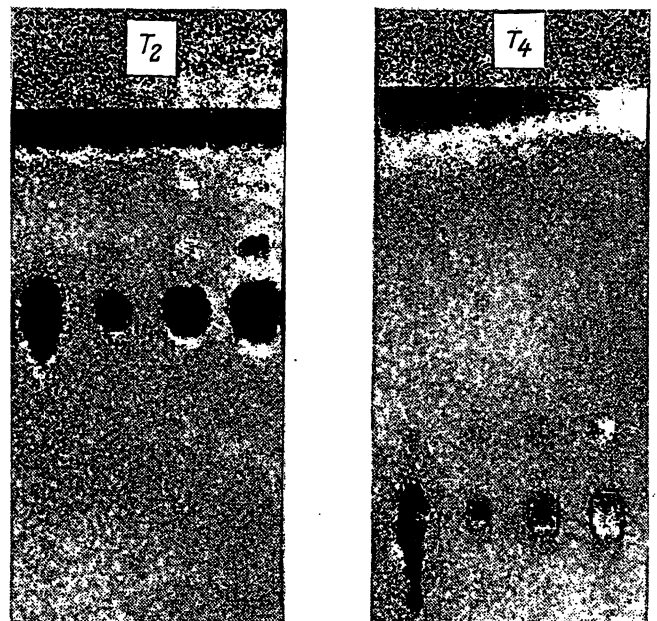


Abb. 2

Chromatogramme butanolischer Lösungen von T_2 und T_4 im Vergleich zu den Chromatogrammen der Ausgangslösungen

In beiden Fällen links das Chromatogramm der Ausgangslösung (5 μg Substanz), rechts daneben je drei Chromatogramme der erhaltenen butanolischen Lösungen (10, 20 und 30 μl).

Ergebnisse

Die Beobachtung der erhaltenen Platten zeigt eine ständige Konkordanz der Flecke der Kontrollchromatogramme mit denen der entsprechenden butanolischen Extrakte, die homogen, gut begrenzt und reproduzierbar sind. In einigen Fällen ist die Neubildung von Substanzen im Laufe der Extraktion durch das Auftauchen anderer Flecken außer denen der Hauptschubstanz auf dem Chromatogramm erkennbar (Abb. 2). Die R_F -Werte jedes Fleckens der butanolischen Extrakte, sowie ihre prozentualen Anteile an den Chromatogrammen sind in Tabelle 1 dargestellt. Wie aus dem Vergleich der Werte

¹⁾ Abkürzungen: FFCA = Ferrichlorid-(Kalium)Ferricyanid-Arsenige-Säure-Reagenz für jodierte Thyronine und Tyrosine nach GMELIN und VIRTANEN; FFC = Modifiziertes GMELIN und VIRTANEN-Reagenz nach POSTMES, Ferrichlorid-(Kalium)Ferricyanid.

Tab. 1

Densitometrische Auswertung, R_F -Werte und Identifikationsreaktionen der Flecke der butanolischen Extrakte (30 μ l).

Ganz links, senkrecht, die Standardsubstanzen nach ihrem chromatographischen Verhalten eingeordnet. Rechts davon, auch senkrecht, die erhaltenen Ergebnisse der Chromatogramme der butanolischen Lösungen. Jedes ausgefüllte Kästchen stellt einen Fleck dar, dessen errechneter prozentualer Anteil, R_F -Werte und Identifikationsreaktionen in dieser Reihenfolge eingetragen sind.

	MIT	DIT	T_1	T_2	T_3	T_4
				12,0% R_F 0,87 FFCA + FFC — Ninhyd. — Pauly's —		
MIT R_F 0,82 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +	100,0% R_F 0,82 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +	13,7% R_F 0,81 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +				
T_1 R_F 0,75 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +			87,6% R_F 0,75 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +	24,4% R_F 0,76 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +		
DIT R_F 0,71 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +		86,3% R_F 0,71 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +				
T_2 R_F 0,65 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +			12,4% R_F 0,64 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +	63,6% R_F 0,65 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +		
T_3 R_F 0,36 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +					100,0% R_F 0,35 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +	22,4% R_F 0,35 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +
T_4 R_F 0,18 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +						77,6% R_F 0,19 FFCA + FFC — Ninhyd. + Pauly's +

hervorgeht, entsprechen die R_F -Werte der Hauptflecke der butanolischen Extrakte mit Genauigkeit denen der Ausgangssubstanzen. Die neugebildeten Verbindungen, die in wesentlich kleineren Mengen auf den meisten der Chromatogramme vorkommen, haben mit nur einer Ausnahme R_F -Werte, die denen irgendwelcher Kontrollsubstanzen entsprechen. Da eine weitere Untersuchung ergab, daß alle dargestellten Substanzen — außer der oben erwähnten Ausnahme — Aminosäuren sind, die phenolische Gruppe besitzen (Tab. 1), liegt es nahe, anzunehmen, daß diese unbekannten Verbindungen mit den Kontrollsubstanzen identisch sind. Das chromatographische Verhalten der so klassifizierten Substanzen und der entsprechenden Kontrollen, die in parallelen Ansätzen in anderen dünnschichtchromatographischen Systemen nicht abwichen, bestätigte diese Auffassung. Von chemischen Veränderungen im Laufe der Extraktion sind hauptsächlich T_2 und T_4 betroffen. Der Anteil der ersten wird durch die Darstellung von zwei neuen Flecken auf dem Chromatogramm der butanolischen Lösung auf 63,6% erniedrigt (Abb. 3). Der Ausfall beträgt bei T_4 22,4% mit einer entsprechenden Neubildung von T_3 . Bei DIT liegt der Ausfall bei 13,7%, bei T_1 bei 12,4%; MIT und T_3 sind nach der Extraktion unverändert.

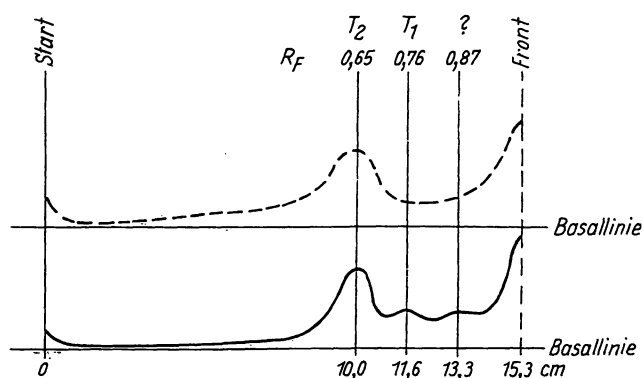


Abb. 3

Extinktionskurven der Chromatogramme der T_2 -Lösungen, vor und nach der Extraktion, vergleichsweise dargestellt.

— — — Ausgangslösung
— butanolischer Extrakt

Diskussion

Die Zersetzung der jodierten Verbindungen im Laufe des Verfahrens sowie die Bildung von Artefakten, von diesen Substanzen ausgehend, sind offene Fragen bei den meisten Extraktionsmethoden von Schilddrüsenhormonen aus Serum oder Gewebe (10, 11). Die Untersuchung reiner wäßr. Lösungen von Jodophenolen

unter denselben Bedingungen und die Analyse der erhaltenen Extrakte gestatten einen objektiven Einblick in das Problem der chemischen Umwandlungen der Ausgangssubstanzen während des Arbeitsganges.

So wurde hier festgestellt, daß die meisten der geprüften jodierten Tyrosine und Thyronine die hier beschriebene Methode ohne große Änderungen überstehen. Die Identität der zurückgewonnenen Substanzen konnte durch übereinstimmende Ergebnisse der chemischen und chromatographischen Analysen mit nur einer Ausnahme zufriedenstellend aufgeklärt werden. Die prozentualen

Verluste der Ausgangssubstanzen ließen sich mit Hilfe der indirekten Auswertung der Chromatogramme gut erfassen.

Von quantitativen Aussagen wurde Abstand genommen: Diese werden als zweite systematische Untersuchung der Leistungen dieser Aufarbeitungsmethode mittels chemischer und isotopischer Methoden aufgeklärt.

Herrn MICHAEL SCHMIDT möchten wir für seine technische Hilfe danken. Frl. H. KERLER sind wir für die Hilfe am Manuskript zu Dank verpflichtet.

Literatur

1. ZAPPI, E., J. Chromatogr. 30, 611 (1967). — 2. GRIES, G., K. H. PFEFFER und E. ZAPPI, Klin. Wschr. 43, 515 (1965). — 3. HOPPE, G., E. ZAPPI und G. GRIES, Nucl.-Med. (Stuttgart) 6, 44 (1967). — 4. ZAPPI, E. und G. HOPPE, diese Z. 5, 209 (1967). — 5. GMELIN, R. und A. I. VIRTANEN, Acta chem. Scand. 13, 1469 (1959). — 6. ZAPPI, E., J. Chromatogr. 31, 241 (1967). — 7. POSTMES, TH., Clin. chim. Acta (Amsterdam) 10, 581 (1964). — 8. WALDI, D., in Dünnschichtchromatographie, Hrsg. E. Stahl, S. 501. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1962). — 9. MORIN, R. J., Clin. chim. Acta (Amsterdam) 13, 395 (1966). — 10. ESCOBAR DEL REY, F., G. MORREALE DE CASTRO und A. A. KASSENAR, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 8, 243 (1956). — 11. TONG, W. und I. L. CHAIKOFF, J. biol. Chemistry 232, 939 (1958).

Dr. E. Zappi
1 Berlin 41
Rubensstraße 125

KURZMITTEILUNGEN

Über den Nachweis des Methamphetamins (Pervitin¹⁾) im menschlichen Speichel

II. Mitteilung zum Problem des Dopings²⁾

Von D. CLASING, H. ALFES, H. MÖLLMANN und J. REISCH

Aus dem Institut für Sportmedizin (Direktor: Prof. Dr. E. J. Klaus) und dem Anatomischen Institut der Universität Münster (II. ordentlicher Lehrstuhl: Prof. Dr. H. Knoche)

(Eingegangen am 29. September 1967)

Der Nachweis von Doping-Mitteln erfolgt heute vorwiegend durch Analyse von Urinproben. Jedoch ist eine verlässliche Harnentnahme durch den Probanden nicht immer gewährleistet, wie z. B. Täuschungsversuche durch Abgabe von Fremdhar n zeigen.

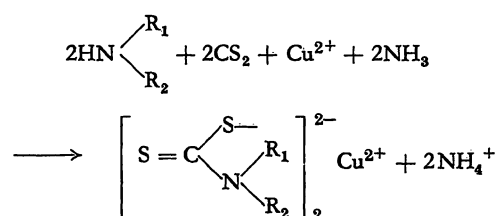
Auch der Nachweis von Dopingmitteln im Blut stößt wegen der Entnahmetechnik bei den zu untersuchenden Personen auf erhebliche Schwierigkeiten, zumal eine Blutprobe bei den derzeitigen gesetzlichen Bestimmungen nicht immer gefordert werden kann. Außerdem ist dieses Verfahren mit einem größeren technischen Aufwand verbunden. Es sollte daher eine gut überprüfbare und leicht ausführbare Nachweismethode angestrebt werden.

Überraschenderweise wurde ein Nachweis von stimulierenden Substanzen im Speichel bisher wenig durchgeführt (1). Dabei ergaben sich bei der Untersuchung dieser Gewebsflüssigkeit wesentliche Vorteile, die sowohl in der Möglichkeit einer raschen Entnahme wie auch in einer guten Kontrollierbarkeit der zu untersuchenden Personen liegen. Ziel dieser Untersuchungen war es daher, einen verlässlichen Nachweis von Dopingmitteln aus dem Speichel zu finden.

Die Versuche beschränkten sich zunächst auf eines der gebräuchlichsten Dopingmittel, D-Methamphetamin (Pervitin). Für die chemische Identifizierung stehen einfach durchzuführende Farb-

reaktionen zur Verfügung. Besonders eignete sich eine Modifikation der Methode von FEIGL (2), die mit körpereigenen Aminen ähnlicher Struktur keine Reaktion zeigt.

Der Nachweis beruht auf der Bildung eines in organischen Lösungsmitteln löslichen Kupfersalzes einer Dithiocarbaminsäure, das bei Einwirkung von Kupferionen, Schwefelkohlenstoff und Ammoniak auf methamphetaminhaltige Lösungen entsteht:



Mit diesem Verfahren läßt sich Methamphetamin nach Gabe von 15 mg pro 70 kg Körpergewicht bereits nach 15–30 Min. im Speichel nachweisen. Der positive Ausfall der Reaktion hält noch mindestens 36 Stdn. an. Diese Untersuchungsergebnisse stehen in Übereinstimmung zu früheren Befunden (3), erlauben jedoch einen schnelleren Nachweis mit geringerem Aufwand. Daher gestattet diese Methode auch eine rasche und einfache Kontrolle am Wettkampfort.

Methodik

Es werden 0,2 mg D-Methamphetamin pro kg Körpergewicht in einer Stekkapsel gegeben, die nach 4–5 Min. Verweildauer im Magen zerfällt (4). Speichel wurde durch Ausspucken oder durch Umspülen mit Wasser entnommen. Die Probe wurde mit 1,0 ml 5proz. Kupfersulfatlösung und 10 Tropfen konz. Ammoniak versetzt. Dann wurde mit einem Gemisch aus Chloroform : Schwefelkohlenstoff (3 : 0,01 v/v) 5 Min. ausgeschüttelt, die Probe zentrifugiert, die Schichten getrennt, die Chloroformphase filtriert und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat visuell oder im Photometer gegen eine Blindprobe verglichen. Es tritt bei positivem Ausfall eine gelbe bis bräunliche Färbung der organischen Phase ein.

¹⁾ 1-Phenyl-2-methylaminopropan.

²⁾ I. Mitteilung: Sportarzt Köln 18, 361 (1967).